

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.04.02

· 基础研究 ·

c-fos 反义脱氧寡核苷酸阻断 VIP 诱导的 VEGF 在小细胞肺癌细胞中表达

赵正源 程庆书 李小飞 王小平 刘锴

【摘要】 背景与目的 血管活性肠肽(VIP)对多种肿瘤细胞的生长具有促进作用,但其作用机制尚有许多未解之处。本研究旨在通过抑制 *c-fos* 基因表达,探讨其表达产物是否参与 VIP 对小细胞肺癌(SCLC)细胞中血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达的调节作用。方法 应用 RT-PCR 技术检测 VIP 作用下 SCLC 细胞系 H446 中 *c-fos* 及 VEGF 基因表达水平,以 *c-fos* 反义脱氧寡核苷酸(ASO)封闭 *c-fos* 基因表达,检测不同 *c-fos* 表达水平条件下 VIP 对 VEGF 表达的调节作用。结果 VIP 增强了 *c-fos* 及 VEGF 在 H446 细胞中的表达。*c-fos* mRNA 的表达在 VIP 作用 2 h 和 4 h 时达到高峰,显著高于 VIP 作用 0 h 时($P < 0.01$)。在 VIP 作用 8 h 和 16 h 时,VEGF mRNA 的表达水平达到高峰,显著高于 VIP 作用 0 h 时($P < 0.01$)。*c-fos* ASO 能明显反转 VIP 诱导的 VEGF 的表达上调($P < 0.01$)。结论 VIP 可能通过增强转录因子 *c-fos* 的表达,进而促进 VEGF mRNA 在肺癌细胞中的表达和分泌,促进肺癌新生血管的生成,参与肿瘤的生长。

【关键词】 小细胞肺癌 血管活性肠肽 *c-fos* 血管内皮生长因子 反义脱氧寡核苷酸 血管形成

【中图分类号】 R734.2

c-fos antisense oligodeoxynucleotide reduces VIP-induced upregulation of VEGF expression in small cell lung cancer cells ZHAO Zhengyuan, CHENG Qingshu, LI Xiaofei, WANG Xiaoping, LIU Kun. Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, P. R. China

Corresponding author: ZHAO Zhengyuan, E-mail: zhenyuan@pub. xionline.com

【Abstract】 Background and objective It has been known that vasoactive intestinal peptide (VIP) has the effect of promoting the growth of some malignant tumors, but its mechanism is not clear. The aim of this study is to use *c-fos* antisense oligodeoxynucleotide (ASO) to block *c-fos* expression and to explore whether *c-fos* can directly regulate VIP-induced VEGF expression in small cell lung cancer (SCLC) cells. **Methods** Expression levels of *c-fos* and VEGF genes were detected in SCLC cell line H446 treated with VIP by RT-PCR. After *c-fos* ASO was added to the H446 cells, the change of VEGF mRNA expression level was analyzed. **Results** Administration of VIP resulted in increased expression of *c-fos* and VEGF mRNA in the H446 cells. The expression of *c-fos* mRNA reached the peak level at 2 h and 4 h after VIP treatment, which was significantly higher than that at 0 h ($P < 0.01$). Whereas, the highest expression level of VEGF mRNA was observed at 8 h and 16 h after VIP treatment, which was significantly higher than that at 0 h ($P < 0.01$). *c-fos* ASO significantly reversed VIP-induced upregulation of VEGF mRNA expression ($P < 0.01$). **Conclusion** VIP can increase the expression and secretion of VEGF in lung cancer cells by activating the transcription factor *c-fos*, then promote the angiogenesis of lung cancer and thus play an important role in the pathogenesis of lung cancer.

【Key words】 Small cell lung cancer Vasoactive intestinal peptide *c-fos* Vascular endothelial growth factor Antisense oligodeoxynucleotide Angiogenesis

血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)是一种含 28 个氨基酸的多肽。既往的研究表明,在肺癌、乳腺癌等多种癌细胞中均存在 VIP,其通过自分泌方式产生后,对肿瘤细胞的生长具有促进作用^[1]。但是, VIP 促进肿瘤生长的机制尚有许多未

解之处。已经知道,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管形成的主要调节因子,其表达上调可促进血管生成^[2]。最近的研究表明, VEGF 的表达上调可促进肿瘤新生血管的生成,参与肿瘤的生长^[3]。已经知道,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管形成的主要调节因子,其表达上调可促进血管生成^[2]。最近的研究表明, VEGF 的表达上调可促进肿瘤新生血管的生成,参与肿瘤的生长^[3]。

作者单位:710038 西安·第四军医大学唐都医院胸外科(通讯作者:赵正源, E-mail: zhenyuan@pub. xaonline.com)

dothelial growth factor, VEGF) 具有促进肿瘤新生血管生成的作用, 从而在促进肿瘤的生长方面发挥着重要作用。许多研究表明肺癌细胞能产生 VEGF, 通过旁分泌机制作用于血管内皮细胞, 促进肺癌血管的生成^[3,4]。我们以往的研究结果观察到在一些非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 细胞系和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC) 细胞系中存在 VEGF mRNA, 而且 VIP 能够增强 VEGF mRNA 在 NSCLC 中的表达^[5], 那么, VIP 对 VEGF mRNA 在 SCLC 中的表达有何作用, 可能的机制是什么, 还不清楚。本研究利用反义脱氧寡核苷酸(ASO) 结合反转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 技术观察了 VIP 对 SCLC 细胞中 VEGF mRNA 表达的影响以及 *c-fos* 癌基因的作用, 以期探讨 VIP 促进肺癌生长作用的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 SCLC 细胞系 H446 为我室保存。RPMI-1640 培养基、胎牛血清、TRIzol 试剂购自美国 Gibco BRL 公司。DTT、RNasin、oligo(DT)₁₂₋₁₅ 和 Superscript II 反转录酶为 Invitrogen 公司产品。Taq DNA 聚合酶为日本 Takara 公司产品。VIP 购自美国 Sigma 公司。ASO 及 PCR 引物由上海博亚生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将细胞系复苏后分别加入含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、0.1 g/L 链霉素和 1.2 mg/L 谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基, 在 5% CO₂、37℃ 恒温箱内培养, 4~6 天传代一次。在细胞达到对数生长期后, 分别接种于 35 mm 培养皿中, 3×10⁵ 细胞/培养皿, 继续培养 24 h。向每个培养皿中加入终浓度为 0.1 μmol/L 的 VIP, 分别培养 0、2、4、8、16 和 24 h 后收集细胞, 提取总 RNA。

1.2.2 *c-fos* ASO 的合成及阻断实验 根据 Genbank 中报道的人 *c-fos* 的 mRNA 序列设计并合成 ASO, 长度为 15 bp, 序列为: 5'-GAACATCATCGTG-GC-3'。同时设计并合成正义寡核苷酸(SO) 作为对照, 序列为: 5'-GCCACGATGATGTTC-3'。上述寡核苷酸均进行全碱基硫代磷酸修饰。

细胞在达到对数生长期后, 分成 4 组, 分别接种于 35 mm 培养皿中, 3×10⁵ 细胞/培养皿, 继续培养 24 h。各组处理如下: ①空白对照组: 加 10 μL 生理盐水; ②单纯 VIP 处理组: 加入终浓度为 0.1 μmol/L 的 VIP; ③SO 处理组: 加入 10 μL SO(50 μg), 孵育 30 min 后加

入终浓度为 0.1 μmol/L 的 VIP; ④ASO 处理组: 加入 10 μL ASO(50 μg), 孵育 30 min 后加入终浓度为 0.1 μmol/L 的 VIP。各组在培养 8 h 后收集细胞, 提取总 RNA。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取 利用 TRIzol 试剂裂解细胞后, 加入 0.2 mL 氯仿, 震荡混匀, 以 6 000 g 离心 10 min。取上层水相, 加等体积异丙酮混合, 室温孵育 10 min。于 4℃ 以 13 000 g 离心 15 min, 弃上清。沉淀块用 400 μL 乙醇冲洗后, 以 20 μL DEPC 处理的去离子水溶解, 并用分光光度计测量 RNA 浓度, 于 -80℃ 保存备用。

1.2.4 反转录合成 cDNA 在 50 μL 的反应体积中加入 2 μg 总 RNA、5×反应缓冲液 10 μL、10 mmol/L dNTPs 5 μL、RNasin (4×10⁵ U/L) 0.5 μL、oligo(DT)₁₂₋₁₅ 0.25 μg、Superscript II 反转录酶(2×10⁴ U/L) 2 μL、0.1 mol/L DTT 0.5 μL, 置 37℃ 孵育 1 h, 然后在 65℃ 加热 5 min, 储存于 -20℃。

1.2.5 PCR 引物设计及合成 按照已报道的人 *c-fos* 及 VEGF mRNA 序列设计相应的特异性引物(*c-fos*: 上游: 5'-TGC TGA AGG AGA AGG AAA AA-3', 下游: 5'-TGC ATA GAA GGA CCC AGA TA-3'; VEGF: 上游: 5'-ACC CAT GGC AGA AGG AGG AG-3', 下游: 5'-ACG CGA GTC TGT GTT TTT GC-3')。同时合成 β-actin 引物(上游: 5'-TGG TGG GTA TGG GTC AGA AGG ACT C-3', 下游: 5'-CAT GGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC A-3'), 作为 PCR 反应时的内参照。*c-fos*、VEGF 和 β-actin 扩增产物的大小分别为 344、433 和 265 bp。

1.2.6 PCR 扩增 在 25 μL 的反应体积中加入 cDNA 0.1 μg、10×PCR 缓冲液 2.5 μL、dNTPs (2 mmol/L) 2.5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL、各引物 (20 μmol/L) 1 μL、Taq DNA 聚合酶(5×10⁶ U/L) 0.5 μL。热循环条件: 93℃ 1 min, 56℃ 30 s, 72℃ 40 s, 进行 1 个循环; 93℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 40 s, 进行 35 个循环; 72℃ 延伸 8 min。

1.2.7 结果分析 取各扩增产物 10 μL, 经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色后, 用 UVP 凝胶成像系统进行检测, 并用 Labworks 软件对各阳性条带进行光量子强度测定。将 VEGF 阳性条带的密度与 β-actin 条带密度的比值作为 VEGF mRNA 的相对表达量。采用 SPSS10.1 分析软件对获得的数据进行方差分析以及 Dunnett 检验。

2 结果

2.1 VIP 上调 *c-fos* 和 VEGF mRNA 在 H446 细胞

系中的表达 向 H446 细胞系中加入 VIP 后, *c-fos* 和 VEGF mRNA 均呈现表达的上调, 而且具有时程变化的特点(图 1)。其中, *c-fos* mRNA 在 VIP 作用 2 h 和 4 h 时表达水平最高, 与 VIP 作用 0 h 时比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); VIP 作用 8 h 和 16 h 时 *c-fos* mRNA 仍显著高于 0 h 的表达水平($P < 0.05$) (图 2)。在 VIP 作用 4 h 时, VEGF mRNA 的表达水平开始增高, 至 8 h 和 16 h 达到最高, 与 0 h 时比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); VIP 作用 24 h 时, VEGF mRNA 的表达水平基本上回落到 0 h 时的水平(图 2)。作为内对照的 β -actin 的表达水平在各时间点基本一致, 表明在 PCR 反应中所加的模板量是相等的。

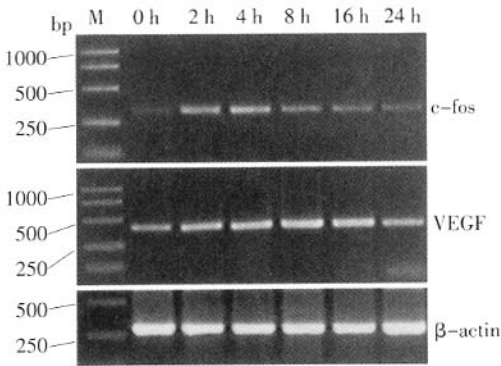


图 1 VIP 对 *c-fos* 和 VEGF mRNA 在 H446 细胞中表达的影响

Fig 1 Effects of VIP on expression of *c-fos* and VEGF mRNA in H446 cells

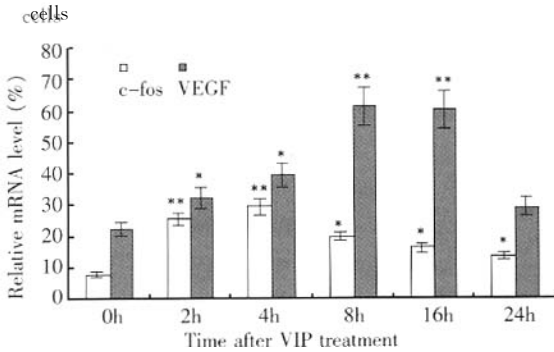


图 2 VIP 作用不同时间后 *c-fos* 和 VEGF mRNA 在 H446 细胞中的相对表达量

Fig 2 Relative expression levels of *c-fos* and VEGF mRNA in H446 cells at different time points after VIP treatment

Compared with 0 h group, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$

2.2 *c-fos* ASO 降低 VIP 诱导的 VEGF mRNA 在 H446 细胞系中的上调表达 由于 VIP 增强 VEGF mRNA 在 H446 细胞中的表达高峰在 8 h, 所以我们选择该时间点来观察 *c-fos* ASO 的作用。结果显示, 在 *c-fos* ASO 处理组, VEGF mRNA 的表达(42.3%)明显降低(图 3), 与单纯 VIP 处理组(86.1%)比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 在 *c-fos* SO 处理组,

VEGF mRNA 的表达(80.3%)与单纯 VIP 处理组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

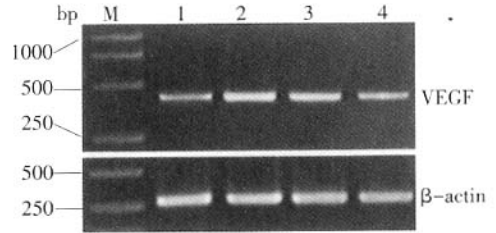


图 3 *c-fos* ASO 对 VIP 诱导的 H446 细胞中 VEGF mRNA 表达上调的影响

Fig 3 Effects of *c-fos* ASO on VIP-induced upregulation of VEGF mRNA in H446 cells

1: Control group; 2: VIP group; 3: *c-fos* SO+VIP group; 4: *c-fos* ASO+VIP group

3 讨论

以往研究表明, 肺癌细胞能产生 VIP, 它是肺癌细胞的自分泌生长因子^[1,6], 在肺癌的生长中起着重要作用。但是 VIP 通过怎样的方式来实现其促进肿瘤生长的作用仍不很清楚。有研究观察到, VIP 受体分布于肺毛细血管的内皮细胞上^[7], 给予 VIP 受体的拮抗剂能够抑制肺癌细胞的生长^[8], 提示 VIP 可能对肺癌组织血管的生长有调节作用。在本研究中我们观察到, VIP 能促进 VEGF mRNA 在 SCLC 细胞系 H446 中的表达, 而且具有时程依赖性的特点, 表明 VIP 能增强 VEGF 在肺癌细胞中的表达, 促进其分泌, 提示 VIP 能促进肺癌的血管生成, 这可能是 VIP 参与肺癌生长的机制之一。

众所周知, 癌基因 *c-fos* 可以作为细胞内的第三信使, 其表达产物 Fos 蛋白能够形成同源二聚体或与另一种第三信使 *c-jun* 蛋白形成异源二聚体, 与靶基因上的转录激活位点 AP-1 结合, 从而促进靶基因的转录。有研究证实, VEGF 基因的表达受转录因子 AP-1 和 AP-2 的调节^[8]。在本研究中, 我们观察到, VIP 能够增强 *c-fos* 基因在 SCLC 细胞 H446 中的表达, 在 VIP 作用 2 h 和 4 h 时即达到高峰, 早于 VEGF mRNA 的表达高峰出现时间。而且, *c-fos* ASO 能够明显反转 VIP 所诱导的 VEGF mRNA 的上调表达。上述结果提示 *c-fos* 可能参与了 VIP 诱导的 VEGF mRNA 在肺癌细胞中的表达。

与 VIP 相耦联的细胞内的信号通路是复杂的, *c-fos* 作为第三信使仅仅位于信号传导通路的下游部分。在 VIP 调节肺癌细胞中 VEGF 基因表达的过程中还有哪些其他的信号分子参与, 仍然需要深入的研

究。另外,在肺癌细胞中还存在多种 VIP 的受体^[9],那么哪些受体介导了 VIP 的促肿瘤生长作用,也还需要进一步的探讨。

参 考 文 献

- 1 Moody TW, Hill JM, Jensen RT. VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides*, 2003, 24(1) : 163-177.
- 2 Zia H, Hida T, Jakowlew S, et al. Breast cancer growth is inhibited by vasoactive intestinal peptide (VIP) hybrid, a synthetic VIP receptor antagonist. *Cancer Res*, 1996, 56(15) : 3486-3489.
- 3 Stefanou D, Goussia AC, Arkoumani E, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the adhesion molecule E-cadherin in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*, 2003, 23(6C) : 4715-4720.
- 4 Shepherd FA, Sridhar SS. Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*, 2003, 41(Suppl 1) : S63-S72.
- 5 Maruno K, Said SI. Small-cell lung carcinoma: inhibition of prolifer-

ation by vasoactive intestinal peptide and helodermin and enhancement of inhibition by anti-bombesin antibody. *Life Sci*, 1993, 52(24) : PL267-271.

- 6 Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J, et al. Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(6) : 495-509.
- 7 Moody TW, Zia F, Draoui M, et al. A vasoactive intestinal peptide antagonist inhibits non-small cell lung cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(10) : 4345-4349.
- 8 Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, 1995, 372(1) : 83-87.
- 9 Moody TW, Walters J, Casibang M, et al. VPAC1 receptors and lung cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 921(1) : 26-32.

(收稿:2005-06-28 修回:2005-11-03)

(本文编辑 李蓓兰)

• 会议消息 •

第十二届世界肺癌大会将于 2007 年 9 月 2 日至 6 日 在韩国首都首尔召开

主办单位:世界肺癌协会(IASLC)

会议出席对象:第十二届世界肺癌大会将是包括有临床医生和科学家参加的肺癌领域中规模最大的一次世界性会议。它的出席对象应包括所有对肺癌及相关问题有兴趣的人员:外科医生、肿瘤内科医生、肿瘤放射科医生、肺科医生、放射学家、病理学家、流行病学家、基础研究科学家和公共卫生专业人员。

联系方法:

赞助:Pia Hirsch Pia.hirsch@uchsc.edu

展览:wclc2007@meet-ics.com

学术日程:Dr. Jin Soo Lee wclc2007@ncc.re.kr

会议总秘书处:International Conference Services, Ltd. (世界会议服务有限公司)

2101-1177 West Hastings Street

Vancouver, BC V6E 2K3 Canada

Tel: 1-604-681-2153

Fax: 1-604-681-1049

E-mail: lungcancer@meet-ics.com

网址:www.2007worldlungcancer.org

www.iaslc.org

重要日期:摘要提交开始 2006 年 10 月 1 日

网上注册开始 2006 年 11 月

摘要提交截至 2007 年 3 月 15 日

摘要接受通知 2007 年 5 月

注册截至 2007 年 7 月